

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO VETERINARIO DE LABORATORIO

**PREVALENCIA Y PERFIL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS
CAUSANTES DE MASTITIS AISLADAS EN LECHE CRUDA BOVINA EN UN
ESTABLECIMIENTO DE LA LOCALIDAD DE SHOENWEIDE DEL DEPARTAMENTO
DE PRESIDENTE HAYES – PARAGUAY**

Autor : FRANCO MEZA, Fátima Carolina

Director : Doctora Gabriela Giacoboni

Codirector : Doctora Estela Bonzo

*Lugar del trabajo: Laboratorio de Control de Calidad de Leche. Área de Microbiología.
Departamento Central - Asunción – Paraguay*

Miembros del Jurado:

Doctora. Fabiana Moredo

Doctor. Eduardo Mórtola

Doctora. Fiorella Alvarado Pinedo

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue identificar bacterias y su resistencia antimicrobiana, en muestras de leche cruda a partir de bovinos con mastitis subclínica (MSC) y clínica (MC), determinadas por recuentos de células somáticas (RCS). El RCS, fue clasificado en 2 categorías; las determinantes de $MSC \geq 200.000$ hasta ≤ 260.000 cél/ml, y las determinantes de $MC > 260.000$ cél/ml, se obtuvieron 142 aislamientos bacterianos. Para analizar la susceptibilidad antimicrobiana, se utilizó el método de concentración inhibitoria mínima, con tarjetas de uso veterinario en el equipo Vitek. Como resultado se obtuvo 56 animales con MC, aislándose las siguientes bacterias: *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecium*, *E. gallinarum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN), *Pseudomonas aeruginosa*, *Kocuria kristinae*. Con MSC, 7 animales, recuperándose *Corynebacterium bovis*, SCN, *Kocuria kristinae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. En la resistencia antimicrobianos, el 44%, 36%, 15% de los SCN mostraron ser resistentes frente a penicilina, tetraciclina y cefpodoxima respectivamente; *S. aureus* 24%, 19% a la cefpodoxina y penicilina; 50% de los *Streptococcus* spp., resistentes a clindamicina y 33% a enrofloxacin y marbofloxacin; *P. aeruginosa* 100% resistente a trimetoprima sulfametoxazol y cloranfenicol. Estos valores nos obligan al control en el uso indiscriminado de estos antibióticos.

ABSTRACT

The objective of the work was to identify bacteria and their antimicrobial resistance, in raw milk samples from bovines with subclinical mastitis (MSC) and clinical (MC), determined by somatic cell counts (RCS). The RCS was classified into 2 categories; the determinants of $MSC \geq 200,000$ up to $\leq 260,000$ cells / ml, and the determinants of $MC > 260,000$ cells / ml, 142 bacterial isolates were obtained. To analyze antimicrobial susceptibility, the method of minimum inhibitory concentration was used, with cards for veterinary use in the Vitek team. As a result, 56 animals were obtained with MC, isolating the following bacteria: *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecium*, *E. gallinarum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negative (CNS), *Pseudomonas aeruginosa*, *Kocuria kristinae*. With MSC, 7 animals, recovering *Corynebacterium bovis*, CNS, *Kocuria kristinae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. In antimicrobial resistance, 44%, 36%, 15% of the CNS showed to be resistant against penicillin, tetracycline and cefpodoxime respectively; *S. aureus* 24%, 19% to cefpodoxin and penicillin; 50% of *Streptococcus spp.*, resistant to clindamycin and 33% to enrofloxacin and marbofloxacin; *P. aeruginosa* 100% resistant to trimethoprim sulfamethoxazole and chloramphenicol. These values force us to control the indiscriminate use of these antibiotics.

Palabras claves: Resistencia antimicrobiana, mastitis clínica, mastitis subclínica, Recuento de células somáticas

INDICE

RESUMEN.....	- 2 -
ABSTRACT	- 2 -
INTRODUCCIÓN	- 4 -
MASTITIS BOVINA.....	- 4 -
Generalidades	- 4 -
Tipos de Mastitis	- 4 -
Agentes etiológicos bacterianos causales de mastitis bovina.	- 6 -
Manejo de la mastitis	- 8 -
Patogenia	- 9 -
Factores de riesgo en los animales.....	- 10 -
Reducción en la composición de la leche y sus efectos económicos	- 12 -
Tratamiento de la mastitis bovina.....	- 13 -
OBJETIVOS	- 15 -
OBJETIVO GENERAL	- 15 -
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	- 15 -
MATERIALES Y METODOS	- 16 -
1. Lugar de estudio:	- 16 -
2. Muestras analizadas:	- 16 -
3. Metodología	- 17 -
RESULTADOS	- 20 -
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	- 23 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 26 -

INTRODUCCIÓN

La producción y calidad de leche como la rentabilidad para los productores, se ve disminuida cuando se presentan patologías como la mastitis, la cual es una enfermedad inflamatoria de origen infeccioso, traumático o tóxico, de alta incidencia en los hatos lecheros a nivel mundial, causante de grandes pérdidas económicas para los productores, debidas al descenso de la producción de leche y a los costos de las terapias instauradas, que también disminuye la calidad de la leche, impactando la inocuidad alimentaria. (Pellegrino et al., 2011; San Martín et al., 2002; Ramírez et al., 2001; Calderón y et al., 2006; Calvino y Tirante, 2005; Piñerez y et al., 2005). En el Paraguay es considerada una enfermedad con alta prevalencia en el ganado lechero y es una de la más importante que afecta la industria lechera considerada una importante fuente de ingreso a nivel nacional.

MASTITIS BOVINA

Generalidades

Varios autores han definido la mastitis, como la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria a una agresión (Kerr y Wellnitz, 2003; Bannerman et al., 2004). Es probablemente la más costosa de las enfermedades infecciosas endémicas que afecta al ganado lechero, ejerciendo un gran impacto en la producción y bienestar animal, así como en la calidad de la leche (Hillerton y Berry, 2005). Se caracteriza por la entrada de células somáticas, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN), a la glándula mamaria y por un aumento en el contenido de proteasa en la leche producida (Kerr y Wellnitz, 2003).

Tipos de Mastitis

Mastitis clínica (MC)

La MC es una enfermedad reconocida comúnmente por los signos clínicos que puede desencadenar signología sistémica como hipertermia, cuartos mamarios inflamados, con aumento de tamaño y enrojecidos. Hay una disminución en la cantidad y calidad de la leche, la que se presenta alterada tanto en su apariencia macroscópica

(grumos) como microscópica (presencia de diferentes células). En algunos casos, llega a estados de fibrosis con pérdida de la función por atrofia de los alvéolos galactóforos (Calderón et al., 2011; Echeverri et al., 2010; Russi, 2008).

Mastitis subclínica (MSC).

Las vacas con MSC no muestran ninguna señal de la enfermedad ni manifestaciones visibles (Kerr y Wellnitz, 2003), (Hansen et al., 2004; Hillerton y Berry, 2005) por lo que es difícil de diagnosticar. La glándula mamaria no presenta alteraciones clínicas y el descenso y aspecto de la leche son normales, a pesar de que se encuentran un aumento en el número de células somáticas y células blancas. (Fernández et al., 2012; Parada et al., 2011; Echeverri et al., 2010) así como una disminución en la producción de leche (Hansen et al., 2004; Hillerton y Berry, 2005).

En hatos lecheros es más común encontrar casos de MSC que de MC, en una relación de 30:1, encontrando que la primera produce mayor disminución de leche por persistir durante largos periodos de tiempo (Echeverri et al., 2010). Los diferentes autores indican que la prevalencia, de cualquier tipo de mastitis, se encuentra entre 15-40% del total de animales de producción. En Argentina se reporta menos del 6% de MC y cerca del 40% para MSC (Manijarrez et al., 2012; Pellegrino et al., 2011; Cruz et al., 2007).

Mastitis crónica

La forma crónica puede comenzar como MC o MSC y puede ser detectada con signos intermitentes de MC. Tiene usualmente un desarrollo progresivo de tejido cicatrizante y muestra un cambio en el tamaño y forma de la glándula afectada, acompañado de pérdidas o reducciones en la producción de leche. El tiempo entre los episodios de MC y MSC puede variar marcadamente, dependiendo de los microorganismos infecciosos, del estrés del animal y otros factores (Philpot y Nickerson, 1993).

Agentes etiológicos bacterianos causales de mastitis bovina.

Patógenos causantes de Mastitis.

Los más comunes son *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Streptococcus agalactiae* (*Strep. agalactiae*) La fuente de contagio es la misma glándula de otras vacas en el establo, sin embargo, las manos de los ordeñadores pueden actuar como una fuente de infección de *S. aureus*. Ambas bacterias, se han aislado de leche de animales con casos de mastitis subclínica. La vía principal de transmisión es de vaca a vaca cuando se utilizan los mismos instrumentos para lavar las glándulas de los animales, así como de pezoneras y equipo de ordeño mal desinfectado. *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) es menos común como causa de mastitis contagiosa, este llega a causar brotes de mastitis clínica que no responden a la terapia y son difíciles de controlar. La mayoría de los brotes por *M. bovis* están asociados a la introducción de nuevos animales en el hato. Estas bacterias que son las más comunes como causa de mastitis contagiosa infectan del 7 al 40% de los animales en el rodeo (Jacobo, et al., 2015).

Patógenos Oportunistas

Los patógenos oportunistas que residen en la piel del pezón tienen la habilidad de provocar una infección intramamaria por una infección ascendente a través del canal del pezón, los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) son las bacterias oportunistas más comunes asociados a mastitis (Bonetto, 2014).

Patógenos ambientales

Este tipo de mastitis está asociada a bacterias que se pueden clasificar en tres grupos:

- a) Coliformes: principalmente *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Klebsiella* spp.
- b) *Streptococcus* spp ambientales: *Strep. dysgalactiae* y *Strep. uberis*.
- c) *Trueperella pyogenes*.

El hábitat de estas bacterias es el medio ambiente en donde se encuentran las vacas, principal fuente de infección debido al manejo inadecuado de las instalaciones y falta de higiene. Son ejemplos de mal manejo, mantener las camas húmedas, establos sucios con humedad, referente al animal se considera una mala administración al inadecuado manejo de la glándula antes del ordeño, presencia de heridas en los pezones y un deficiente control de moscas. Las bacterias coliformes son una causa

común de mastitis clínica, ocasionalmente de presentación muy aguda. En el caso de *Trueperella pyogenes* se puede aislar como causa de mastitis estacional ya que afecta principalmente a vacas secas y a vacas que se encuentran en la última etapa de la gestación.

Dentro de los microorganismos causantes de mastitis, *S. aureus* a nivel mundial es la bacteria más prevalente y de mayor patogenicidad (Fernández et al., 2012; Pellegrino et al., 2011; Boscan et al., 2009; Haveri et al., 2005). Estudios realizados en Chile, indican que esta bacteria es la más frecuente y sobre la cual se ha desarrollado más resistencia a antimicrobianos (Betancourt et al., 2003). Sin embargo, en otro estudio desarrollado en las regiones V y X de Chile se encuentra una prevalencia de *E. coli* de 40,7%, seguida por *S. aureus* con 16% (San Martín et al., 2002). En Argentina, indican que 75,3% de las cepas aisladas fueron del género *Staphylococcus* spp., dentro de las cuales cerca del 30%, fueron *S. aureus* y el porcentaje restante correspondió a *Streptococcus* spp., *E. coli* y *Bacillus* spp. (Pellegrino et al., 2011).

En Paraguay, se aislaron 5 géneros bacterianos predominantes en leche cruda, siendo estos *Staphylococcus* spp. (46,4%), *Streptococcus* spp. (18,6%), *Corynebacterium* spp. (18,3%), *Klebsiella* spp. (12,9%) y *E. coli* (3,8%) (Florentín, 2007). Otros microorganismos aislados de la leche, como saprofitos o como patógenos son: *Micrococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Listeria* spp., *Corynebacterium* spp., *Microbacterium* spp., *Propionibacterium* spp. y *Clostridium* spp. Dentro de las gramnegativas se incluyen: *E. coli*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y la familia *Enterobacteriaceae* (Russi, 2008). En Montería (Colombia), en hatos de doble propósito, el principal género de bacterias productoras de mastitis fueron diferentes tipos de *Staphylococcus* seguidas por *Streptococcus* y finalmente, *Corynebacterium* y *E. coli* (Calderón et al., 2011). En el estado de Pernambuco (Brasil) se tomaron muestras de 185 vacas, resultando en 708 cuartos muestreados. Se aislaron microorganismos patógenos en el 61% de las muestras con mayor prevalencia para *Corynebacterium* spp. (45%), *Staphylococcus* spp. (29,6%) y *Streptococcus* spp. (14,6%) en ordeño manual; *Staphylococcus* spp. (36,4%), *Corynebacterium* spp. (27,6%), *Micrococcus* spp. (15,6%) y *Streptococcus* spp. (12,9%) en ordeño mecánico. Los rebaños ordeñados mecánicamente tuvieron mayor prevalencia de mastitis subclínica, tanto para el diagnóstico por la prueba de California (CMT), como para el recuento de células somáticas (RCS) y cultivo bacteriológico (Ruiz et al., 2011).

Manejo de la mastitis

National Mastitis Council en su publicación sobre “Principios para la Prevención de la Mastitis Bovina”, describe la aplicación de trece puntos de manera conjunta para establecer un programa de control de la mastitis de forma más correcta para mejorar la calidad de la leche. Entre estos puntos se encuentran: evitar las nuevas infecciones, mantener los animales en un medio ambiente seco y cuidado, establecer pautas de tratamiento adecuadas y eliminar los animales incurables (Bramley, 1996).

En el manejo integral de las MC y MSC se incluye el uso de antimicrobianos, administrados vía sistémica e intramamaria respectivamente. Dentro de los grupos farmacológicos más utilizados se destacan betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas), nuevos betalactámicos, macrólidos y algunos aminoglucósidos. Sin embargo, algunos de estos antimicrobianos también son utilizados con fines profilácticos, durante el periodo de secado para reducir la mastitis en la siguiente lactancia (Pellegrino et al., 2011; Bajwa et al., 2007; Betancourt et al., 2003).

La emergencia de la resistencia antimicrobiana tiene como consecuencia la disminución de la eficacia de los tratamientos tradicionales, así como en la salud pública, por la transmisión de microorganismos al ser humano a través de la leche. (Costa y Reineman, 2004).

El desarrollo de resistencia es un proceso dinámico y progresivo, que debe ser estudiado de manera periódica en las diferentes regiones del mundo. (Becerra et al., 2009). La identificación de las bacterias clínicamente significativas aisladas de procesos infecciosos y los resultados de los estudios de sensibilidad, constituyen herramientas fundamentales para un manejo eficiente del paciente infectado. La rapidez en el diagnóstico y tratamiento reduce no sólo la morbilidad y mortalidad sino también la propagación de la infección (Barenfanger et al., 1999.; Doern et al., 1994).

Durante las últimas décadas se han desarrollado equipos automatizados y semiautomatizados que permiten identificar a las bacterias y la sensibilidad a los antimicrobianos en un período de tiempo que oscila entre 2 y 7 h comparado a las 48 h que como mínimo habitualmente demoran los métodos tradicionales (Sung et al., 2000; O'Hara et al., 1997; Robinson et al., 1995). Existen diferentes tipos de equipos. La diferencia entre éstos radica en varios factores: la rapidez y confiabilidad en los resultados de identificación y sensibilidad antimicrobiana, el espectro de

microorganismos abarcado, los costos de mantenimiento, control de calidad y la presencia de un software anexo con capacidad de controlar los mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia antimicrobiana.

VITEK (Laboratorio bioMérieux, Argentina) es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (Jorda et al., 2004).

Patogenia

Las Células Somáticas

Las células somáticas están constituidas por una asociación de leucocitos y células epiteliales y normalmente están presentes en la leche en niveles bajos. Los leucocitos en la leche son una respuesta a la inflamación que puede aparecer debido a una enfermedad o, a veces, tras una lesión. Cuando los microorganismos causantes de mastitis invaden un cuarto de la ubre y empiezan a multiplicarse o cuando el número de estos aumenta significativamente en un cuarto infectado, el organismo de la vaca responde con leucocitos para combatir a dichos microorganismos causantes de la mastitis (Philpot, 2001). Las células epiteliales se desprenden del revestimiento del tejido de la ubre (Blowey y Edmondson, 1995). La presencia de un incremento del número de estas células dentro del alveolo es un indicador como respuesta a la infección; aun cuando no han sido detectadas al observar la leche de la vaca (como ocurre en la MSC) (Carrión, 2001). El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer datos claves sobre la función y el estado de salud de la glándula mamaria lactante y debido a su cercana relación con la composición de la leche es un criterio muy importante que constituye la calidad de la leche (Wolter y Kloppert, 2004). Las bacterias ambientales están presentes en el medio ambiente de la vaca, en su piel, suelo, charcos de agua, etc. y penetran en la ubre cuando se dan determinadas condiciones. Una vez que las bacterias ingresan a las células en el interior de la glándula mamaria se inicia la respuesta inmunitaria del organismo enviando glóbulos blancos para neutralizar a las bacterias invasoras. Estos glóbulos blancos son en esencia lo que

constituye los conteos de células somáticas. Un alto RCS en la leche de vacas individuales o en el tanque de enfriado significa que las bacterias han invadido la glándula. (García, 2004). Las bacterias que invaden el canal del pezón pueden clasificarse en patógenas o ambientales. El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en periodo lactante; debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante (Bedolla y Castañeda, 2004; Wolter et al., 2004). (Tabla 1)

Células/ml de leche	Estado de la ubre
Hasta 100.000	Sana, leche normal
De 100.000 a 200.000	Sospechoso, nivel fisiológico superior
Más de 200.000	Mastitis, leche anormal

Tabla 1. Diagnóstico de un cuarto según el conteo de células somáticas. **Fuente:** Carlos Bedolla Cedeño (2004). Importancia del conteo de las células somáticas en la calidad de la leche bovina

Efectuar conteos celulares somáticos es un procedimiento común, sobre todo en la industria láctea para medir la calidad de la leche. En el rodeo se utiliza como indicador de las infecciones. Cuando el RCS resulta elevado, ya sea de una vaca o del tanque enfriador, indica que hay un problema de mastitis.

El RCS es la medición más ampliamente utilizada para supervisar el estado inflamatorio de las glándulas mamarias; puede ser realizada en la leche en: a) cuartos individuales, b) vacas individuales, c) el hato completo d) un grupo de hatos. La infección intramamaria es el principal factor causante de cambios en el RCS en la leche. Más del 98% de las células somáticas que se encuentran en la leche provienen de las células blancas que ingresan a la misma en respuesta a la invasión bacteriana de la ubre. Un alto RCS se asocia con la pérdida de la producción de leche (García, 2004).

Factores de riesgo en los animales

Las causas que determinan un alto contenido de células somática en la leche son:

- * La infección de la glándula mamaria.
- * La edad de la vaca y el estado de lactancia.

En general las células somáticas aumentan con la edad y el estado de lactancia.

Al final de la lactancia y en las primeras semanas posteriores al parto se puede producir aumento del RCS independientemente del nivel de infección en la glándula mamaria. Este aumento parece ser producto de un mecanismo natural de defensa inmunitario preparatorio del parto para incrementar las defensas orgánicas de la glándula mamaria en el momento tan crítico como lo es el periodo perinatal. Aquellos cuartos sin infección reducen rápidamente el RCS dentro de pocas semanas posteriores al parto.

- * Estrés y estación del año.

- a) Ambientales: excesivo calor, tiempo muy frío, lluvias prolongadas, vientos fuertes, nevadas, sequías, inundaciones.

- b) Régimen de vida: instalaciones precarias, comederos y bebederos de poca capacidad, ambientes sucios, oscuros, ventilación exagerada o deficiente, hacinamiento, promiscuidad.

- c) Manejo: destete, embarques, transportes, cambios de potrero, arreos largos y apresurados, ordeño, vacunaciones.

- d) Nutrición: hambre, sed, sobrealimentación, cambios de nutrición, pasturas succulentas, secas, aguas salobres, alimentos inadecuados para el bovino.

- e) Enfermedades: víricas, micóticas, parasitarias, intoxicaciones.

- f) Quirúrgicos (Hinsch, 1974)

Sin embargo, la evidencia experimental indica que estas causas solo pueden provocar limitados cambios en el RCS.

- * El RCS es bajo cuando las vacas se mantienen en ambientes higiénicos, secos y confortables como las praderas bien manejadas. Las condiciones climáticas y el manejo en general son factores importantes dentro de un programa permanente sobre control deben aplicarse constantemente

- * Lesiones en la ubre

Las lesiones en la ubre pueden aumentar temporalmente el RCS incluso sin que exista infección de la glándula mamaria. Estos aumentos serán de corta duración y mejorarán en la medida que sanen las heridas que la provocaron. El tejido dañado es susceptible a la infección, por lo tanto, es importante la prevención de traumatismos de la ubre, preocupándose de evitar la existencia de alambres, palos, pisos resbaladizos, puentes, alcantarillas en mal estado, dormideros de dimensiones y materiales

inapropiados, etc.

* Causas indirectas

Rutinas de ordeño inadecuadas contribuyen significativamente a generar nuevas infecciones debido a la transmisión de la mastitis durante el ordeño. El resultado es un elevado RCS. Adicionalmente, equipos defectuosos o instalaciones inadecuadas, falta de mantenimiento de los equipos de ordeño, elementos de goma no cambiados de acuerdo con las especificaciones del fabricante, insuficiente capacidad de vacío, fluctuaciones de vacío, no cortar el vacío antes de retirar las pezoneras pueden causar traumas y dañar el pezón y transmitir agentes infecciosos durante el ordeño. Por lo tanto, la revisión periódica del equipo de ordeño por personal especializado debe realizarse al menos dos veces al año (Butendieck, 1997).

Reducción en la composición de la leche y sus efectos económicos

Cuando el RCS del hato aumenta, se observa una disminución correspondiente en la producción de leche. Esta disminución se produce como consecuencia del daño infligido al tejido que produce la leche por las bacterias o de las toxinas que elaboran. Una investigación canadiense ha demostrado que la producción de leche disminuye en un 2,5% por cada aumento de 100.000 en el recuento de células a partir de la cifra básica de 200.000. Es de esperar que en un hato con un recuento de 500.000 tenga una disminución del 7,5% en la producción debido a la MSC. En los hatos con tratamientos correctos de la mastitis, se puede mantener con facilidad un recuento de 200.000 y por ello se propuso esta cifra como valor de referencia en el cual existen disminuciones insignificantes de la producción (Blowey y Edmondson, 1995).

Cuando la leche de todas las vacas en el hato se mezcla, como en el tanque a granel, el RCS en una muestra compuesta es un buen indicador de la prevalencia de la mastitis en el hato. Un RCS mayor a 200.000 cél/ml indica la presencia de mastitis subclínicas. Los RCS por debajo de 400.000 cél/ml en tanques son típicos de los hatos que poseen buenas prácticas de manejo, pero que no hacen un particular énfasis en el control de la mastitis. Los hatos que poseen un programa de control efectivo de la mastitis poseen en forma consistente conteos por debajo de las 100.000 cél/ml. Conteos de células somáticas mayores de 500.000 cél/ml indican que un tercio de las glándulas se encuentran infectadas y que la pérdida de leche debido a mastitis subclínica es mayor

de 10% (García, 2004).

El recuento de células somáticas en el tanque (BTSCC) permite definir los valores mínimos de células somáticas permitidos en el tanque de la leche, asumiendo que un bajo porcentaje de las vacas presentan cuartos lecheros con prueba positiva al CMT y consecuentemente, bajos valores de RCS. Estos valores tienen una implicación de gran importancia para el control de calidad de la leche y son la base de los estándares internacionales para su comercialización (Muñoz et al., 2007).

Desde el punto de vista económico los bajos RCS significan para el productor:

- Aumento en la producción de leche
- Disminución del número de vaquillas de reemplazo
- Menos leche de descarte
- Reducción en el costo de medicamentos y del veterinario
- Aumento en el rendimiento del producto final (García, 2004).

Tratamiento de la mastitis bovina

Si bien existen numerosos factores que influyen en la presentación de la mastitis, estos responden principalmente a la infección por microorganismos patógenos, entre los cuales algunas especies bacterianas juegan un rol particularmente importante. Considerando este aspecto la terapia de mastitis clínica se focaliza en la eliminación del agente infeccioso, utilizando como primera herramienta terapéutica los antimicrobianos (San Martín, et al., 2002).

Durante las últimas décadas se han obtenido numerosos compuestos antimicrobianos de incuestionable utilidad e incluso antimicrobianos de uso exclusivo en medicina veterinaria. Pero paralelamente se ha instalado el debate acerca del incremento de la resistencia a los tratamientos antimicrobianos y la consecuente amenaza contra la eficacia de estos (Bonetto, 2014). Para seleccionar un antimicrobiano, el médico veterinario no solo necesita conocer el agente etiológico involucrado, sino también su susceptibilidad a los antibióticos.

En general, la respuesta es mayor en mastitis, por *Strep. agalactiae* y *Strep. dysgalactiae*, ya que estos organismos están asociados a los conductos y a la leche dentro de la glándula. Por el contrario, *S. aureus* puede estar confinado dentro de los

neutrófilos o protegido por el tejido cicatrizal y la correlación entre pruebas de susceptibilidad *in vitro* y eficacia *in vivo* es menor. Finalmente, es prioritario que las vacas con mastitis agudas sean detectadas en forma temprana y tratadas rápidamente, ya que una demora de unas pocas horas puede ser la diferencia entre el éxito y el fracaso. Asimismo, se deben evitar los preparados caseros, aplicando sólo formulaciones de reconocida eficacia. La aplicación intramamaria de productos no formulados para esa vía y en condiciones higiénicas inadecuadas puede llevar a la proliferación de infecciones severas por patógenos ambientales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la prevalencia y perfil de resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis aisladas en leche cruda bovina en un establecimiento de la localidad de Shoenweide del Departamento de Presidente Hayes – Paraguay

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- * Aislar e identificar las especies de bacterias presentes en muestras de leche cruda bovina con diagnósticos de mastitis clínicas y subclínicas según conteo de células somáticas.
- * Evaluar el comportamiento de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y Enterobacterias aisladas en este trabajo frente a los diferentes antimicrobianos utilizados en Paraguay para el tratamiento de mastitis.

MATERIALES Y METODOS

1. Lugar de estudio:

- * Localidad de Schoenweide– Presidente Hayes – Región Oriental del Paraguay (Gráfico 1). Es una localidad paraguaya del Departamento de Boquerón. Forma parte de una de las colonias menonitas que se sitúan en el Chaco Paraguayo.



Gráfico 1: Estancia Schönweide – Presidente Hayes – Región Oriental del Paraguay. * La estancia se encuentra resaltada en color rojo.

2. Muestras analizadas:

Se analizaron todos los bovinos lecheros (83), resultando en 332 cuartos muestreados, en producción en distintos estadios de lactancia (entre 56 y 508 días) que habitan en la estancia Schönweide.

3. Metodología

a. Métodos de conteo electrónico celular por citometría de flujo

Se tomaron muestras de los 332 cuartos muestreados de los 83 animales, en 2 frascos estériles de 60 ml, uno de ellos para el análisis bacteriológico y el otro con el conservante Bronopol (marca Broad spectrum Microtabs) para la determinación del RCS en el equipo Fossomatic™. Se colocaron los frascos estériles de 60 ml con muestras de leche dentro de un baño termostático a 40° C. Se analizaron las mismas en el equipo Fossomatic, el mismo tiñe las células somáticas con un colorante fluorescente (bromuro de etidio) para obtener una reacción con el ADN de las células. Debido a que el bromuro de etidio penetra en la célula y forma un complejo fluorescente con el ADN nuclear, la célula produce un pulso eléctrico que se amplifica y pasa frente a una luz especial y un detector registra cada célula somática. Entre cada muestra el aparato limpia su sistema de flujo para evitar el efecto del arrastre de una muestra a otra (Carrión, 2001).

Dado a que ningún autor establece un umbral inicial para RCS para la MC, pero si para la MSC que sería > 200.000 cél / ml donde coinciden Bedolla 2004, Butendieck 1997 y Garcia 2004, clasificamos los recuentos para análisis en cuanto sigue:

- Recuentos menores a 200.000 células somáticas no se sometieron a pruebas bacteriológicas porque se consideraron sanas
- Recuentos ≥ 200.000 hasta ≤ 260.000 células somáticas se consideraron como mastitis subclínica.
- Recuentos > 260000 células somáticas se consideraron como mastitis clínica.

b. Aislamiento bacteriológico

Cada muestra de leche con recuento de células somáticas mayor a 200.000 se sembró en agar sangre, agar Mac Conkey, y agar Baird Parker (Marca Britania). Se incubaron a 37°C de 24 a 72 horas. Las muestras en las cuales no se registraron desarrollo en ninguno de los medios de cultivo sembrados en el período estipulado, se consideraron negativas. En las placas donde hubo crecimiento, se procedió a la toma de una muestra de cada colonia, la cual se montó en un portaobjetos para la tinción de Gram y luego se realizó la observación en microscopio óptico con objetivo de inmersión a 100x.

c. Pruebas confirmatorias para la identificación final de bacterias

A los cocos Gram positivos, se realizó la prueba de catalasa y aglutinación en Latex (Staphaurex Plus – REMEL); posteriormente el inóculo de trabajo se preparó a partir de colonias de cocos Gram positivos aislados en 3ml de solución fisiológica-agua destilada (1:1), hasta una turbidez equivalente a 5,0–6,3 de McFarland, utilizando el instrumento DensiCheck® provisto por bioMérieux, según las indicaciones del fabricante. El inóculo preparado se dispensó en la tarjeta GP (Tarjetas de identificación VITEK®2 GP– BIOMERIEUX), a través de un tubo de poliestireno estéril. Las tarjetas fueron colocadas en el Vitek 2; las tarjetas se llenaron, incubaron y leyeron dentro del equipo. Los datos obtenidos de cada prueba fueron interpretados según la base de datos del instrumento, para tipificar al microorganismo en estudio.

Los bacilos Gram negativos que desarrollaron en agar Mac Conkey se realizó la prueba de oxidasa, posteriormente el inóculo de trabajo se preparó a partir de colonias de cocos Gram positivos aislados en 3ml de solución fisiológica-agua destilada (1:1), hasta una turbidez equivalente a 5,0–6,3 de McFarland, utilizando el instrumento DensiCheck® provisto por bioMérieux, según las indicaciones del fabricante. El inóculo preparado se dispensó en la tarjeta GN (Tarjetas de identificación VITEK®2 GN– BIOMERIEUX), a través de un tubo de poliestireno estéril. Las tarjetas fueron colocadas en el Vitek 2; las tarjetas se llenaron, incubaron y leyeron dentro del equipo. Los datos obtenidos de cada prueba fueron interpretados según la base de datos del instrumento, para tipificar al microorganismo en estudio.

d. Determinación de la resistencia antimicrobiana

En *Staphylococcus*, *Streptococcus*, enterobacterias y *Pseudomonas* se determinó la resistencia por la metodología de concentración inhibitoria mínima utilizando de la tarjeta VITEK®2 - AST GP67 (BIOMERIEUX), o VITEK®2 - AST GN65 (BIOMERIEUX), (según corresponda la tinción de Gram) exclusivas de uso veterinario para VITEK®2 compac (Jorda et al, 2004), la misma está compuesta por antimicrobianos y el análisis se realizó mediante un software para la conjugación de datos. Los puntos de cortes se cargaron en el sistema VITEK®2 compac, según las normas establecidas por el CLSI Edición 26, 2016 (Clinical and Laboratory Standards Institute), que analiza los puntos de cortes conforme se ingresan los datos en el software del equipo.

La resistencia a betaláctamicos fue evaluada mediante TouchSticks Beta-Lactamase– OXOID, en *Staphylococcus*.

Los antimicrobianos evaluados por el sistema en la tarjeta en el equipo fueron penicilina, amoxicilina, ácido clavulánico, oxacilina, cefalotina, cefpodoxima, enrofloxacin, marbofloxacin, eritromicina, clindamicina, vancomicina, tetraciclina, rifampicina, trimetoprim sulfametoxazol, nitrofurantoina, cloranfenicol, gentamicina en la Tarjetas ASTGP76 y en Tarjetas ASTGN65: amoxicilina, ácido clavulánico, ampicilina, cefpodoxima, ceftiofur, amicacina, gentamicina, tobramicina, tetraciclina, marbofloxacin, cloramfenicol, enrofloxacin, trimetoprim sulfametoxazol.

Análisis estadístico:

Se obtuvo la información de la población total de individuos del tambo en todos los estadios de lactancia.

El diseño correspondió a un estudio de tipo descriptivo, contemplando las siguientes variables: tipo de bacteria encontrada, RCS, presencia de resistencia antimicrobiana.

Se determinó la presencia de grupos bacterianos con el fin de calcular la prevalencia en las muestras de leche analizadas.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta el primer objetivo se clasificaron los animales según el conteo de células somáticas en bovinas que presentan MC y MSC, de los 83 animales que corresponde a los 332 muestras de los cuartos analizados, en el 75,9% (63/83) de los animales (252 cuartos) se obtuvieron RCS ≥ 200.000 cél/ml, dichas muestras de leche fueron sometidos a análisis microbiológico.

El resultado del RCS de las muestras permitió clasificar el estado sanitario de las vacas en las siguientes categorías: el 67,5% (56/83) con MC, el 8,5% (7/83) con MSC y el 24% (20/83) sanas.

Microorganismos	%	Valor absoluto
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34,5	49
<i>Escherichia coli</i>	7,7	11
<i>Serratia marcescens</i>	0,7	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	19,0	27
<i>Staphylococcus sciuri</i>	2,1	3
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	7,0	10
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4,9	7
<i>Staphylococcus epidermis</i>	1,4	2
<i>Staphylococcus warnei</i>	0,7	1
<i>Staphylococcus cohnii</i>	0,7	1
<i>Staphylococcus capitis</i>	0,7	1
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0,7	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2,1	3
<i>Streptococcus uberis</i>	1,4	2
<i>Streptococcus ssp</i>	0,7	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,7	1
<i>Enterococcus faecium</i>	2,1	3
<i>Enterococcus gallinarum</i>	0,7	1
<i>Corynebacterium bovis</i>	0,7	1
<i>Kocuria kristinae</i>	6,3	9
<i>Micrococcus</i>	2,1	3
<i>Brevibacillus brevis</i>	2,8	4

Tabla 2. Porcentajes y valores absolutos de microorganismos aislados

Teniendo en cuenta el total de las muestras en las cuales se realizó el aislamiento y la caracterización microbiológica (63/83), se aislaron 142 cepas bacterianas, sobre las mismas se analizaron los microorganismos y encontramos, *Pseudomonas aeruginosa* 34,5% (49/142), *S. aureus* 19% (27/142), SCN 17% (25/142), Enterobacterias 8,4% (12/142), *Strep. uberis* 1,4% (2/142), *Strep. dysgalactiae* 2,1% (3/142) y *Streptococcus*

spp. 0,7% (1/142), *Kocuria kristinae* 6,3% (9/142), *Enterococcus faecalis* 0,7% (1/142), *Enterococcus gallinarum*, 0,7% (1/142), *Enterococcus faecium* 2,1% (3/142), *Brevibacillus brevis* 2,8% (4/142), *Micrococcus* 2,1% (3/142), *S. hyicus* 0,7% (1/142), y *Corynebacterium bovis* 0,7% (1/142). El detalle de estos aislamientos se presenta en la tabla 2.

Las bacterias aisladas a partir de leche cruda de animales con **mastitis subclínicas** fueron *Corynebacterium bovis* 100% (1/1), SNC 12% (3/25), *Kocuria kristinae* 11,1% (1/9), *Pseudomona aeruginosa* 8,2% (4/49), y *S. aureus* 3,7 % (1/26). El resumen de estos aislamientos se encuentra en la Tabla 3.

Las especies bacterianas encontradas en **mastitis clínicas** fueron *Strep. dysgalactiae* 100% (3/3), *Strep. uberis* 100% (2/2), *Enterococcus faecium* 100% (3/3), *Enterococcus gallinarum* 100% (1/1) y *E. coli* 100% (11/11), *S. aureus* 96,2% (26/27), SCN 92% (23/25), *Pseudomonas aeruginosa* 91,8% (45/49), *Kocuria kristinae* 88,9% (8/9). En la Tabla 3 se muestra estos resultados.

Clasificación	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	SCN	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Kocuria kristinae</i>	<i>Streptococcus sp</i>
≥200.00 a ≤260000	8,2			3,7		12,0				11,1	
≥260000	91,8	100,0	100	96,2	100	88,0	100,0	100,0	100,0	88,9	100,0

Tabla 3. Porcentajes de microorganismos encontrados según promedio de células somáticas

Al evaluar el comportamiento de las bacterias frente a los antimicrobianos que se utilizan para el tratamiento de mastitis causadas por *Staphylococcus*, *Streptococcus* y Enterobacterias encontramos que el 19% de los *S. aureus* resultaron resistentes a la penicilina y el 15% resultaron resistente a la cefpodoxima. El 44% de los SCN, resultaron resistentes a la penicilina, el 24% resultaron resistentes a la cefpodoxima y el 36% resultaron resistentes a la tetraciclina. El 33% de los *Streptococcus* spp. resultaron resistentes a la enrofloxacin y a la marbofloxacin y 50% de resistencia a la clindamicina. (Tabla 4 y 5).

Pseudomonas aeruginosa y *Serratia marcescens*, presentaron 100% de resistencia a la ampicilina, amoxicilina ácido clavulanico, ceftiofur, enrofloxacin, nitrofurantoina y tetraciclina. Además de los antibióticos citados *Pseudomona*

aeruginosa resultó 100% resistente a trimetoprima sulfametoxazol y cloranfenicol.

Los aislamientos de *E. coli* resultaron sensibles a todos los antibióticos testados.

Antibiotico	RESISTENTE	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE
	Porcentaje %		Valor absoluto	
Amoxicilina Ac. Clavulanico	100	0	27	0
Cefalotina	100	0	27	0
Cefpodoxima	85	15	23	4
Clindamicina	96	4	26	1
Cloramfenicol	96	4	26	1
Enrofloxacina	96	4	26	1
Eritromicina	100	0	27	0
Gentamicina	100	0	27	0
Marvofloxacina	96	4	26	1
Nitrofurantoina	96	4	26	1
Oxacilina	100	0	27	0
Penicilina	81	19	22	5
Rifampicina	96	4	26	1
Tetraciclina	96	4	26	1
Trimetoprim sulfametoxazol	100	0	27	0
Vancomicina	100	0	27	0

Tabla 4. Resistencia en porcentaje y valor absoluto de las 27 cepas de *S. aureus*

Antibiotico	RESISTENTE	SENSIBLE	RESISTENTE	SENSIBLE
	Porcentaje		Valor absoluto	
Amoxicilina Ac. Clavulanico	4	96	1	24
Cefpodoxima	36	64	9	16
Gentamicina	0	100	0	25
Enrofloxacina	0	100	0	25
Marvofloxacina	0	100	0	25
Trimetoprim sulfametoxazol	0	100	0	25
Nitrofurantoina	0	100	0	25
Cloramfenicol	0	100	0	25
Tetraciclina	24	76	6	19
Penicilina	44	56	11	14
Oxacilina	4	96	1	24
Cefalotina	4	96	1	24
Rifampicina	0	100	0	25
Eritromicina	4	96	1	24
Clindamicina	4	96	1	24
Vancomicina	4	96	1	24

Tabla 5. Resistencia en porcentaje y valor absoluto de las 25 cepas de SCN.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El RCS, que comúnmente se expresa en número de células por mililitro (Philpot, 2001; Bedolla et. al., 2007) es una herramienta muy valiosa en la toma de decisiones para la implementación de medidas de prevención y control de mastitis (Gill et al., 1990; Carrión, 2001; Wolter y Kloppert, 2004) ya que en la leche producida por una glándula mamaria sana normalmente este parámetro se encuentra en niveles bajos ($RCS \leq 200.000$ cél/ml) (Wolter y Kloppert, 2004).

Se puede observar en el este trabajo que en el 75,9% de las muestras cultivadas de los animales (63/83) se aislaron *S. aureus*, *S. hyicus*, SCN, *Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae*, *Enterococcus* spp, Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium bovis* y *Kocuria kristinae*. Estos hallazgos coinciden con los encontrados por Calderón y Rodríguez (2008) en el Altiplano Cundiboyacense (Colombia) quienes determinaron que el 49% de los cultivos bacteriológicos de muestras de leche eran procedentes de cuartos mamarios positivos al CMT. En el valle de Ubaté se encontró que el 67,9% de las MSC correspondieron a este mismo grupo de microorganismos contagiosos (Contreras y Ordoñez 1994).

El 19% de las muestras analizadas en el presente trabajo con recuentos ≥ 200.000 cél/ml resultaron positivas para *S. aureus*, las cuales fueron asociadas a MSC. El principal microorganismo asociado a MSC en los hatos estudiados en la provincia de Pamplona (Norte de Santander, Colombia) fue *S. aureus* (74,4%) el cual se asocia con la ocurrencia de mastitis de tipo contagioso; esto parece derivarse de malas prácticas de ordeño, y están relacionadas de manera significativa con la presencia de MSC; por su parte, las mastitis contagiosas se asocian con la presencia de un número importante de vacas con pocos cuartos infectados, por lo que se requiere implementar medidas básicas de control que apunten fundamentalmente a la prevención y la capacitación constante del personal involucrado directamente con el proceso; estas medidas tradicionales podrían reducir el riesgo de incidencia de la enfermedad (Mendoza et al. 2017). *Strep. uberis* fue aislado en el 1,4% de las muestras de leche analizadas, lo que coincide también, con Calderón y Rodríguez (2008), quienes lo aislaron en el 5,74%, de los animales, porcentaje superior al reportado por Gómez, et al (1982) del 2,5% para la Sabana de Bogotá. Es importante tener en cuenta esta bacteria, ya que cuando los programas de control de mastitis contagiosas son efectivos se puede incrementar su prevalencia, adicionalmente, es un microorganismo que tiene una amplia distribución en

el hato y se puede aislar de los genitales externos, de la piel de la ubre y de los pezones de las vacas, de la cama y de cualquier material que entre en contacto con la materia fecal (Roberson et al., 1996).

Strep. dysgalactiae fue aislado en el 2,1% de las muestras analizadas, porcentaje menor a 7,6%, reportada por Gómez et al (1982), y del 5,3% por Langoni et al (1991). Prevalencias entre el 20 y 25% de este patógeno fueron halladas en mastitis subclínica y clínica en los países nórdicos (Saxena, 1993).

Fueron encontrados 8,4% de Enterobacterias porcentaje menor a lo encontrado por Mendoza et al. (2017) donde, el 13,3% eran coliformes en las muestras analizadas en la provincia de Pamplona (Norte de Santander, Colombia). Las malas prácticas ganaderas en la implementación de las medidas profilácticas, hace que algunos de estos microorganismos puedan llegar a desarrollar signos sistémicos en la vaca e incluso, provocar la muerte (Calderón y Rodríguez, 2008).

Para evaluar los perfiles de resistencia de los aislamientos obtenidos, se realizaron ensayos de resistencia *in vitro* frente a 16 agentes antimicrobianos para cocos Gram positivos y 12 para bacilos Gram negativos de uso para el tratamiento de la mastitis bovina. De las 63 cepas 27 (19%) fueron *S. aureus*. El 18,5% (5/27) y 14,8% (4/27) del total de las cepas de *S. aureus* fueron resistentes a penicilina y cefpodoxia, respectivamente. Todas las cepas analizadas fueron sensibles a amoxicilina ácido clavulánico, gentamicina, trimetoprima sulfametoxazol, oxacilina, cefalotina y vancomicina.

En estos últimos años los SCN están emergiendo como potenciales bacterias responsables de infecciones intramamarias en las explotaciones lecheras modernas, siendo frecuentemente los más aislados. Existen claras evidencias, principalmente en casos subclínicos, como también en mastitis clínicas leves y subclínicas de larga duración que ocasionan una reducción en la producción de leche además de un daño en los tejidos glandulares (Bonetto, 2014). Por lo tanto, este trabajo concuerda con lo expresado por Bonetto debido a que el 17,5 % (25/63) de los aislamientos resultaron ser SCN y con un perfil de resistencia del 44% a la penicilina, el 24% resultó resistente a la cefpodoxima y el 36% resultó resistente a la tetraciclina.

Pseudomonas aeruginosa actúa como oportunista al invadir tejidos débiles o lesionados de las glándulas mamarias. El mal funcionamiento del equipo de ordeño aumentaría el riesgo de contraer infecciones por esta bacteria y otras bacterias, debido a traumatismos en el extremo del pezón. Vacas inmunológicamente comprometidas

debido a otras enfermedades infecciosas o deficiencias nutricionales son también más susceptibles a las infecciones por este agente. A pesar de que *Pseudomonas aeruginosa* no infecta las glándulas mamarias que ya están infectadas con otras bacterias, pueden convertirse en un problema para el bienestar de los animales que tienen una baja prevalencia de infecciones no clínicas causadas por *Strep. agalactiae* o *S. aureus* (Kirk y Mellenberger, 1995).

Es más probable que la glándula mamaria no se infecte clínicamente con este microorganismo cuando se expone repetidamente a pequeños números de la bacteria en lugar de a muy grandes números. La cantidad de estas bacterias en el agua contaminada suele ser bajo. Es probable que se desarrollen infecciones no clínicas cuando el agua contaminada se utiliza para lavar las tetinas, en corrales de aspersión y para mezclar la inmersión de tetina concentrada. Las infecciones clínicas generalmente resultan de una exposición única a grandes cantidades. Ejemplos de una exposición importante incluirían el uso de drogas contaminada y tetinas o equipos de tratamiento. Las vacas secas son susceptibles a antibióticos contaminados con agua contaminada utilizada para calentar antibióticos (Kirk y Mellenberger, 1995).

Dado que en el tambo analizado del total de las muestras se encontró un 34% de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* (49/63), se debería tratar de eliminar este agente causal ya que el mismo está presente en mayor proporción en animales con RCS >260.000 indicando que los animales tanto con MSC como clínica presentan este microorganismo en la leche ordeñada, con una resistencia reportada del 100% a una cantidad importante de antimicrobianos.

Un resultado un poco extraño fue la presencia de *E. coli* que resultó sensible a todos los antibióticos testados, el problema en este tambo no sería la higiene precisamente sino el control de la mastitis por causas de otra índole y el agua contaminada con *Pseudomonas* probablemente.

Kocuria kristinae es un coco Gram positivo, de la familia *Micrococcaceae*, que forma parte de la microbiota de la piel, las mucosas y la orofaringe de los seres humanos y algunos mamíferos, varias de estas bacterias han sido aisladas en muestras de origen ambiental y animal (Venice, 2014), en los análisis automatizados con Vitek-2 que es una herramienta confiable la identifiqué en varias repeticiones, dando como resultado que su presencia sería por el mal condicionamiento del lugar donde se realiza el ordeño.

BIBLIOGRAFÍA

- Bajwa, N.S., Bansal, B.K., Srivastava, A.K. y Ranjan, R. 2007. Pharmacokinetic profile of erythromycin after intramammary administration in lactating dairy cows with specific mastitis. *Veterinary Research Communication* 31: 603-610.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee J, Zhao X, Hope JC, y Rainard P. 2004. *Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus*. Elicit Differential Innate Immune Responses Following Intramammary Infection. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 11 (3): 463-472.
- Barenfanger J, Drake C, Kacich G. 1999. Clinical and financial beneficts of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J ClinMicrobiol*. 37: 1415-8.
- Becerra, G., Plascencio, A., Luévanos, A., Domínguez, M. y Hernández, I. 2009. Mecanismos de resistencia a antibacterianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas* 29 (2): 70-78.
- Bedolla, C. C. y Castañeda, V. H. 2004. Métodos de detección de mastitis bovina. Mimeo. FMVZ-UMSNH. México. pp. 37-42.
- Bedolla C, Hernández J, García E. Importancia del conteo de las células somáticas en la calidad de la leche bovina. Disponible en: <https://www.monografias.com/trabajos57/celulas-somaticas-bovina/celulas-somaticas-bovina.shtml>
- Bedolla, C. C., Castañeda, V. H. y Wolter, W. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. *REDVET. Rev. Electrón. Vet.* Vol. VIII, No 9, septiembre. 17 pp.
- Betancourt, O, Sscarpa, C, Villagrán, K. 2003. Estudio de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos en tres sectores de la IX región de Chile. *Revista Científica FCV-LUZ* 13 (5): 413-417.
- Blowey, R. y Edmondson, P. 1995. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. *Acribia*. Zaragoza. 208 pp.
- Bonetto, C. 2014. Mastitis bovina Causada por *Staphylococcus coagulasa* negativos. La Plata, Argentina.
- Boscan O. J., Villarroel, N. R., Oviedo B.A., Sánchez, V.A., Pino, R. D., García, B., Hernández, G, L., Gonzalez, B. M. 2009. Bacterias patógenas potenciales al inicio del periodo seco de vacas doble propósito con mastitis subclínica. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=95911669010>. Accesado: 20/01/2013.
- Boscan O. J., Villarroel N. R., Oviedo B.A., SánchezV.A., Pino, R. D., García, B., HernandezZ, G, L., Gonzalez, B. M. 2009. Bacterias patógenas potenciales al inicio del periodo seco de vacas doble propósito con mastitis subclínica.
- Bramley, A.J., J.S. Cullor, R.J. Erskine, L.K. Fox, R.J. Harmon, J.S. Hogan, S.C. Nickerson, S.P. Oliver, K.L. Smith, and L.M. Sordillo. 1996. Current Concepts of Bovine Mastitis. Fourth Edition. National Mastitis Council. Madison, WI. 64 pages.
- Brown, R. W., Morse, G. E., Newbould, S. H. F. y Slanetz, L. W. 1969. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Washington, D.C.

Burvenich, C., Monfardini, J., Mehrzad, A., Capuco, V. y Paape, M. J. 2005. El papel de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos en la mastitis coniforme en bovinos. 23-26.

Butendieck, N. 1997. Células somáticas, Mastitis y Calidad de leche. CRI – Carillanca. Disponible en: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/seriesinia/NR22423.pdf>

Calvinho, L.F.; Cavavesio, N.; Aguirre, R.; Almeida, S. 2000. Bacteriological bulk tank milk quality from dairy farms with high and low somatic cells counts in the central dairy area of Argentina. Proc. 39 th Annual Mtg. Buenos Aires. Argentina N. M. C. Pp 174-145.

Calvinho, L. F. y Tirante, L. 2005. Prevalencia de microorganismo patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 4 (1-2)

Calderón, A.; Garcia, F.; Martínéz, G. 2006. Indicadores de calidad de leches de crudas en diferentes regiones de Colombia. Rev. MVZ, Córdoba. 11 (1): 725-73.

Calderón A, Rodríguez VC. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias. 21(4): 582-589.

Calderón, R. A., Rodríguez, R. V., Arrieta, B. G y Mattar, V. L. 2011. Prevalence of mastitis in dual-purpose cattle farms in Montería (Colombia): etiology and antibacterial susceptibility. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 24:19-28.

Carrión, G. M. 2001. Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de la leche. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación Para el Desarrollo Integral Regional de Michoacán. pp. 22-32. Leer más: <http://www.monografias.com/trabajos57/celulas-somaticas-bovina/celulas-somaticas-bovina2.shtml#ixzz4UdDUBSLy>

Calvinho, L.; Titante, L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. Rev. FAVE Secc. Cien. Vet. 4(1):29-40.

Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility testing standards. 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th Edition.

Contreras DL, Ordóñez M. 1994. Prevalencia y dinámica de la mastitis bovina en el valle de Ubaté. Bogotá. Departamento de Microbiología, Facultad de Bacteriología, Pontificia Universidad Javeriana.

Costa, D.; Reinemann, D. 2004. El propósito de la rutina de ordeño. Instituto Babcock, Universidad de Wisconsin. Ordeño y Calidad de Leche No. 407. En Línea: <http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/documents/productdownload/du_407.es.pdf. 26/03/2012>.

Cruz, C.A., Espita, C.E., Hernández, L.J.J.A y Sanabria, V.J.P. 2007. Identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos. Revista UDCA. Actualidad & Divulgación Científica 10: 81-89.

Doern G.V, Vautour R, Gaudet M, Levy B. 1994. Clinical impact of rapid *in vitro*

susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol*, 32: 1757-62.

Echeverri, Z. J. J., Jaramillo, M. G. & Restrepo, B. L. F. 2010. Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia. *Revista. Lasallista Investigación* 7(1): 49-57.

Fernández, B. O. F., Trujillo, G. J. E., Peña, C. J. J. y Cerquera, G. J. 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. *Redvet*. 13 (11):1-11. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111112.html>. Accesado: 10/01/2013.

Florentín, A. 2007. Perfil de resistencia in vitro a antimicrobiano de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción. *Mem. InstInvestig. Cienc. Salud*, Vol. 5(1).Junio.

García, A. D. 2004. Células somáticas y alto recuento bacteriano. ¿Cómo controlarlo? *J. DairySci.*: 4031-5. • García, S. R. 2003. Células somáticas una advertencia sin darnos cuenta. *Holstein de México*. 34 (8): 27-28.

Gómez L, Pinilla R, Jaramillo E. Diagnóstico y control de mastitis bovina en la región de Umbita (Boyacá). Trabajo de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 1982. 106p.

Hansen PJ, Soto P, y Natzke RP. 2004. Mastitis and Fertility in Cattle-Possible Involvement of Inflammation or Immune Activation in Embryonic Mortality. *American Journal of Reproductive Immunology*.51: 294-301.

Haveri, M.; Suominen, S.; Rantala, L.; Hlonkanen-buzalsk, T. &Pyörälä, S. 2005. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology* 106: 97-102.

Hillerton, JE y Berry, EA. 2005, Methods of detection of the bovine mastitis. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. VIII, N° 9, 2007.

Hinsch, O. 1974. El stress del Ganado. *Dinámica Rural*, Bs.As., 67:23-27. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar

Jacobo G.L.F, Ruiz R.R.A., Martínez C.I. 2015. Diagnóstico de mastitis subclínica en vacas próximas al secado y evaluación de un secado parenteral. *Revista ganadería intensiva*. Disponible en: www.ganaderia-intensiva.com

Jorda, V.; Vila, A.; Lanza, A, Bomvehi, P.; et all. 2004. Utilidad del sistema *VITEK* en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta bioquím. clín. latinoam*. v.39 n.1 La Plata ene./mar.

Kerr D.E, y Wellnitz O. 2003. Mammary Expression of New Genes to Combat Mastitis. *J Anim. Sci*. 81 (suppl.3): 38-47.

Kirk, J. y Mellenberger, R. 1995. La mastitis: una visión general. *Illinois-Iowa, Dairy Handbook*, SUA-ED, FMVZ, UNAM.México. pp. 43-45. • Martínez, J. R., Gonzalo, C., Carriedo, J. A. y San Primitivo, F. 2003. "Effect of Freezing on Somatic Cell Counting in Ewe Milk", *J. Dairy Sci*. 86:2583-2587.

Kleinschroth, E. 1991. "La mastitis". *Revista Bayvet*. junio-agosto. Editado por Laboratorios Bayer S. A. de C. V. México, D. F.: 8-10.

Langoni H, Pinto MP, Domínguez P, Listoni FJP. 1991. Aetiology and drug sensitivity of subclinical bovine mastitis. *ArquivoBrasil Med Vet Zootec*; 43:507-545.

Manijarrez, L.A.M., Díaz, Z.S., Salazar, G.F., Valladarez, C.P., Gutiérrez, C.A., Barboza, P.A., M. Talavera, R.M., Alfonso, S.M. y Velazquez, O.V. 2012. Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis Conexión Agropecuaria JDC Vol. 3 - Núm. 1. Enero - Junio 2013 - pp. 53 - 73 Facultad de Ciencias Agrarias - Artículos de Revisión 71 subclínica en la región centro-este del Estado de México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 3(2): 265-274.

Mediano, P. 2016. Etiología y epidemiología de las mastitis humanas. Madrid, España. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/38785/1/T37619.pdf>

Medina, R. J. J. 2002. Prevalencia e identificación de agentes etiológicos causantes de mastitis en el Municipio de Vista Hermosa, Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México 39-41 y 83.

Mendoza J. A., Vera Y. A., Peña L. C. 2017. Prevalencia de mastitis subclínica, microorganismos asociados y factores de riesgo identificados en hatos de la provincia de Pamplona, Norte de Santander. Rev. Med. Vet. Zoot. 64(2),

Muñoz, M.; Agudelo, A.; Maldonado, J. 2007. Relación entre el recuento de células somáticas individual o en tanque de leche y la prueba CMT en dos fincas lecheras del departamento de Antioquia (Colombia). Rev Col Cienc Pec; 20:472 – 483

O'Hara, C. Westbrook G, Miller M. 1997. Evaluation of VITEK GNI+ and Becton Dickinson Microbiology Systems Crystal E/NF Identification Systems for Identification of members of the family Enterobacteriaceae and other gram-negative, glucose-fermenting and non-glucose-fermenting bacilli. J ClinMicrobiol , 35: 3269-73.

Parada, J.L., Goncalvez, D., Soccol, V.S., Lima, M. y Soccol, C.R. 2011. Bovine Mastitis in the Metropolitan Area of Curitiba: Antibiotic Resistance and Antimicrobial Control of the Infection. Brazilian Archives of Biology and Technology 54 (4): 709-716.

Pérez CG, Bedolla CC, Castañeda VH. 2005. Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche. Sustentabilidad. Vol. III, No 1. Universidad de Guadalajara, Jalisco., México. pp. 86-94.

Pellegrino, M.; Frola, I.; Odierno, L.; Bognia, C. 2011. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. REDVET Rev. Electrón. Vet. 12 (7).

Philpot, W. N. 2001. Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. León Guanajuato. México. 26 pp.

Philpot, W. N. y Nickerson, S. C. 1992. Mastitis: El contra ataque. Publicado por Surge Internacional. Naperville, IL. U.S.A. pp. 13-15.

Philpot, W. N. y Nickerson, S. C. 1993. Mastitis: El contraataque. Publicado por Surge Internacional. BabsonBros Ed., III. U.S.A.

Ramírez, N., Gaviria, G., Arroyabe, O., Sierra, B. y Benjumea, J. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 14 (1): 76-87.

Remy D, Chastant S y Mialot JP. 2001. Les mammites chez les bovines. Reproduction, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Maisons Alfort, San Martin, B.; Morales, M.; Aguero,

H.; León, B.; Espinoza, S.; Iraguen, D.; Puga, J. y Borie, C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región Metropolitana y Xa Región, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria 34 (2): 221-234.

Reza, G. L. C. 2000. Mastitis bovina su reconocimiento clínico, programas de prevención y su terapia con antimastiticos a base de cefapirinas. Mastitis bovina su reconocimiento clínico. México D. F.: 1-13.

Roberson J.R., Lawrence K., Hancock D.D., Gay J.M., Besser T. 1996. Prevalence of coagulase positive Staphylococci, other than Staphylococcus aureus, in bovine mastitis. AJVR 57 (Suppl):54-58

Ruiz, A.K., Ponce P., G. Gomes G., Mota R.A., Sampaio, E., Lucena** y S. Benone E.R. 2011. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: Comparación entre ordeño manual y mecanico, en Pernambuco, Brasil. Revista Salud Animal. v.33 n.1

Russi, N. 2008. Susceptibilidad de antibióticos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina. Tesis para optar el título de Magíster Scientiae en Ciencias Veterinarias, Mención Salud Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Litoral. Esperanza, Argentina.

Robinson, A. McCarter YS y Tetreault J. 1995. Comparison of Crystal Enteric/Nonfermenter System, API 20E System, and VITEK Automicrobic system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol, 33: 364-70.

San Martín, B., Morales, M.A., Agüero, H., León, B., Espinoza, S., Iraguen, D., Puga, J. y Borie, C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región Metropolitana y Xa Región, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria 34 (2): 221-234.

Saxena RK, Dutta GN, Borah P, Buragohan J. 1993. Incidence and etiology of bovine subclinical mastitis. Indian Vet J; 70 (Suppl):1079-1080

Sung L, Yang DJ, Hung CC, Tsung Ho H. 2000. Evaluation of SCAN-W/A and the VITEK GNI automicrobic system for identification of non-glucose fermenting gram-negative bacilli. J Clin Microbiol, 38: 1127-30.

Wellenberg, G. J., van der Poel, W. H. M. y Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Veterinary Microbiology, Article 2361, pp. 2-21

Wolter, W., Castañeda H., Kloppert, B y Zschöck, M. 2004. Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. México. pp. 12-37.

Wolter, W., y Kloppert, B. 2004. Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina. Guadalajara, Jalisco, México. 5 pp.